



①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Off nlegungsschrift**  
⑩ **DE 195 11 243 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 195 11 243.1  
㉔ Anmeldetag: 27. 3. 95  
㉕ Offenlegungstag: 4. 1. 96

⑤① Int. Cl. 6:  
**C 07 K 14/495**  
C 07 K 14/195  
A 61 K 38/18  
C 07 K 16/00  
C 12 N 15/18  
C 12 N 15/70  
C 12 N 15/80  
C 12 N 15/82  
C 12 N 15/85  
C 12 N 5/10  
C 12 N 1/21  
C 12 N 1/15  
// C12N 15/11,15/74  
(C12N 1/21,C12R  
1:19)

DE 195 11 243 A 1

③⑩ Innere Priorität: ③② ③③ ③①  
01.07.94 DE 44 23 190.3

⑦① Anmelder:  
Biopharm Gesellschaft zur biotechnologischen  
Entwicklung von Pharmaka mbH, 69115 Heidelberg,  
DE

⑦④ Vertreter:  
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

⑦② Erfinder:  
Hötten, Gertrud, 69245 Bammental, DE; Neidhardt,  
Helge, 35041 Marburg, DE; Bechtold, Rolf, 69126  
Heidelberg, DE; Pohl, Jens, 76707 Hambrücken, DE

⑤④ Neuer Wachstums-/Differenzierungsfaktor der TGF- $\beta$ -Familie

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Protein der TGF- $\beta$ -Familie, die  
dafür codierende DNA und eine ein solches Protein enthal-  
tende pharmazeutische Zusammensetzung.

DE 195 11 243 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNESDRUCKEREI 11.95 508 061/720

16/39

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft einen neuen Wachstums-/Differenzierungsfaktor der TGF- $\beta$ -Familie und dafür codierende DNA-Sequenzen.

Zu der TGF- $\beta$ -Familie von Wachstumsfaktoren gehören die BMP-, TGF- und Aktivin/Inhibin-verwandten Proteine (Roberts und Sporn, Handbook of Experimental Pharmacology 95, 419-472 (1990)). Sie sind für einen weiten Bereich medizinischer Behandlungsmethoden und Anwendungen relevant. Diese Faktoren eignen sich in Verfahren, welche die Wundheilung und die Gewebewiederherstellung betreffen. Weiterhin induzieren mehrere Mitglieder der TGF- $\beta$  Familie das Gewebewachstum, wie zum Beispiel das Wachstum von Knochen.

Wozney (Progress in Growth Factor Research 1 (1989), 267—280) und Vale et al. (Handbuch of Experimental Pharmacology 95 (1990), 211—248) beschreiben verschiedene Wachstumsfaktoren, wie etwa diejenigen, die mit der BMP- und der Aktivin/Inhibin-Gruppe verwandt sind. Die Mitglieder dieser Gruppe weisen signifikante strukturelle Ähnlichkeiten auf. Der Vorläufer des Proteins besteht aus einer aminoterminalen Signalsequenz, einer Propeptid- und einer carboxyterminalen Sequenz von 110 bis 140 Aminosäuren, die vom Vorläufer abgespalten wird und das reife Protein darstellt. Weiterhin sind ihre Mitglieder durch eine Aminosäuresequenz-homologie definiert. Das reife Protein enthält die am höchsten konservierten Sequenzen, insbesondere sieben Cysteinreste, die unter den Familiemitgliedern konserviert sind. Die TGF- $\beta$ -artigen Proteine sind multifunktionelle, hormonell aktive Wachstumsfaktoren. Sie weisen auch verwandte biologische Aktivitäten, wie etwa chemotaktische Attraktion von Zellen, Förderung der Zelldifferenzierung und Gewebe-induzierende Fähigkeiten auf. EP 0 222 491 A1 offenbart Sequenzen von Inhibin alpha und beta Ketten.

Insgesamt zeigen die Proteine der TGF- $\beta$ -Familie Unterschiede in ihrer Struktur, was zu erheblichen Variationen in ihrer genauen biologischen Funktion führt. Weiterhin werden sie in einem weiten Bereich unterschiedlicher Gewebearten und Entwicklungsstufen gefunden. Folglich können sie Unterschiede hinsichtlich ihrer genauen Funktion, z. B. der erforderlichen zellulären physiologischen Umgebung, ihrer Lebensdauer, ihrer Zielorte, ihrer Erfordernisse für Hilfsfaktoren und ihrer Beständigkeit gegen Abbau aufweisen. Obwohl zahlreiche Proteine, die ein Gewebe-induktives Potential zeigen, beschrieben werden, müssen ihre natürlichen Aufgaben im Organismus und noch bedeutsamer ihre medizinische Relevanz noch im Detail erforscht werden. Das Vorhandensein von noch unbekannten Mitgliedern der TGF- $\beta$ -Familie, die für die Differenzierung/Induktion von verschiedenen Gewebearten bedeutsam sind, wird mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen. Eine große Schwierigkeit bei der Isolierung dieser neuen TGF- $\beta$ -artigen Proteine besteht jedoch darin, daß ihre Funktionen noch nicht genau genug für die Entwicklung eines unterscheidungskräftigen Bioassays beschrieben werden können. Andererseits ist die erwartete Nukleotidsequenzhomologie zu bekannten Mitgliedern der Familie zu gering, um ein Screening durch klassische Nukleinsäurehybridisierungstechniken zu ermöglichen. Dennoch ist die weitere Isolation und Charakterisierung von neuen TGF- $\beta$ -artigen Proteinen dringend erforderlich, um weitere Induzierungs- und Differenzierungsproteine bereitzustellen, die alle gewünschten medizinischen Erfordernisse erfüllen. Diese Faktoren könnten medizinische Anwendung bei der Heilung von Schäden und der Behandlung von degenerativen Erkrankungen von verschiedenen Geweben finden.

In der Patentanmeldung PCT/EP93/00350 ist eine Nukleotid- und Aminosäuresequenz für das TGF- $\beta$ -Protein MP-121 angegeben, wobei ein Großteil der dem reifen Peptid entsprechenden Sequenz angegeben ist. Die vollständige Sequenz des Propeptids MP-121 wird nicht offenbart.

Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe besteht darin, DNA Sequenzen bereitzustellen, die für neue Mitglieder der TGF- $\beta$ -Proteinfamilie mit mitogenem und/oder Differenzierungs-induktivem Potential codieren. Insbesondere besteht die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, die vollständige DNA- und Aminosäuresequenz des TGF- $\beta$ -Proteins MP-121 bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein DNA-Molekül, das für ein Protein der TGF- $\beta$ -Familie codiert und

- a) den für das reife Protein codierenden Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz,
- b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz,
- c) eine einem allelischen Derivat einer der Sequenzen aus (a) und (b) entsprechende Nukleotidsequenz, oder
- d) eine mit einer der Sequenzen aus (a), (b) oder (c) hybridisierende Sequenz umfaßt

unter der Voraussetzung, daß ein DNA-Molekül gemäß (d) zumindest den für ein reifes Protein der TGF- $\beta$ -Familie codierenden Anteil enthält.

Weitere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung betreffen den Gegenstand der Ansprüche 2 bis 10. Andere Merkmale und Vorteile der Erfindung gehen aus der Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen hervor. Die Sequenzprotokolle und Zeichnungen werden jetzt kurz beschrieben.

SEQ ID NO. 1 zeigt die vollständige Nukleotidsequenz der für das TGF- $\beta$ -Protein MP-121 codierenden DNA. Das ATG-Startcodon beginnt mit Nukleotid 128. Der Start des vollständigen reifen Proteins beginnt mit Nukleotid 836.

SEQ ID NO. 2 zeigt die vollständige Aminosäuresequenz des TGF- $\beta$ -Proteins MP-121, die aus der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz abgeleitet wurde. Der Beginn des bevorzugten reifen Proteins liegt bei Aminosäure 237.

Fig. 1 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenz von MP-121 mit einigen Mitgliedern der TGF- $\beta$ -Familie (Inhibin  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten) mit Beginn am ersten der sieben konservierten Cysteinreste. \* bedeutet, daß die Aminosäure in allen verglichenen Proteinen gleich ist; + bedeutet, daß die Aminosäure in mindestens einem der Proteine im Vergleich zu MP-121 übereinstimmt.

Fig. 2 zeigt die Nukleotidsequenzen der Oligonukleotidprimer, die in der vorliegenden Erfindung verwendet wurden und einen Vergleich dieser Sequenzen mit bekannten Mitgliedern der TGF- $\beta$ -Familie. M bedeutet A oder C, S bedeutet C oder G, R bedeutet A oder G und K bedeutet G oder T. 2a zeigt die Sequenz des Primers OD, 2b zeigt die Sequenz des Primers OI.D.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung umfaßt der Begriff "reifes Protein" darüber hinaus aber auch funktionelle Teilbereiche des Gesamtproteins, die im wesentlichen gleiche biologische Aktivität aufweisen und vorzugsweise solche Teilbereiche, die mindestens den Bereich der sieben in der TGF- $\beta$ -Familie konservierten Cysteine umfassen. Insbesondere ist es hierbei möglich, daß der N-Terminus des reifen Proteins leicht modifiziert ist, also von der in SEQ ID NO. 2 gezeigten Sequenz abweicht. Es können hier sowohl zusätzliche Aminosäuren, die die Funktionalität des Proteins nicht beeinflussen, vorhanden sein als auch Aminosäuren fehlen, soweit auch in diesem Fall die Funktionalität nicht eingeschränkt ist. Bevorzugt ist jedoch, daß das Protein alle Aminosäuren ab Aminosäure 237 der in SEQ ID NO. 2 gezeigten Aminosäuresequenz enthält. Von anderen Familienmitgliedern der TGF- $\beta$ -Familie ist bereits bekannt, daß das Anhängen zusätzlicher Aminosäuren an den N-Terminus des reifen Proteins die Aktivität nicht beeinträchtigt, wobei u. a. 6 zusätzliche Histidine am N-Terminus angehängt wurden.

Die vorliegende Erfindung umfaßt also den für das reife Protein gemäß obiger Definition codierenden Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz sowie Sequenzen, die dieser Sequenz im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechen und allelische Derivate solcher Sequenzen. Weiterhin umfaßt die vorliegende Erfindung auch mit derartigen Sequenzen hybridisierende Sequenzen unter der Voraussetzung, daß ein solches DNA-Molekül zumindest den für ein reifes Protein der TGF- $\beta$ -Familie (gemäß der obigen Definition) codierenden Anteil vollständig enthält und die biologische Aktivität erhalten bleibt.

Der Begriff "funktioneller Anteil" im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet einen Proteinanteil, der in der Lage ist, z. B. als Signalpeptid-, Propeptid- bzw. reifer Proteinanteil zu wirken, d. h. mindestens eine der biologischen Funktionen der natürlichen Anteile von MP-121 erfüllen.

Der für den reifen Anteil des Proteins codierende Bereich reicht vorzugsweise von Nukleotid 836 bis zum Stopcodon, welches bei Nukleotid 1184 der in der SEQ ID NO. 1 gezeigten Sequenz beginnt. Gegebenenfalls kann das DNA-Molekül noch weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Sequenz umfassen, nämlich die für den Signal oder/und Propeptidanteil codierenden Nukleotidsequenzen. Besonders bevorzugt umfaßt das DNA-Molekül die Sequenz für den Signal- und Propeptidanteil und den Anteil des reifen Proteins, d. h. die Nukleotide 128 bis 1184 der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Sequenz. Andererseits kann das DNA-Molekül neben dem für das reife Protein codierenden Anteil auch noch funktionelle Signaloder/und Propeptidanteile von anderen Proteinen, z. B. von Proteinen mit Cystine Knot Motif (Cell, Vol. 73 (1993), S. 421—424) und insbesondere von anderen Proteinen der TGF- $\beta$ -Familie, z. B. den oben genannten Aktivin/Inhibin- oder BMP-Proteinen, insbesondere auch MP52 (siehe PCT/EP94/02630) umfassen. Die entsprechenden Nukleotidsequenzen sind aus den oben genannten Referenzen zu entnehmen, auf deren Offenbarung hiermit Bezug genommen wird. Wichtig ist hierbei, daß der richtige Leserahmen für das reife Protein erhalten bleibt. Je nachdem, in welchen Wirtszellen die Expression stattfindet, könnte das Vorhandensein einer anderen Signalsequenz oder/und eines anderen Propeptidanteils die Expression positiv beeinflussen. Der Austausch von Propeptidanteilen durch entsprechende Anteile anderer Proteine ist z. B. bei Mol. Endocrinol. 5 (1991), 149—155 und Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 2905—2909 beschrieben.

Obwohl die allelischen, degenerierten und hybridisierenden Sequenzen, die von der vorliegenden Erfindung umfaßt werden, strukturelle Unterschiede aufgrund geringfügiger Änderungen in der Nukleotid- oder/und Aminosäuresequenz aufweisen, besitzen die von derartigen Sequenzen codierten Proteine noch im wesentlichen die gleichen nützlichen Eigenschaften, die ihren Einsatz in grundsätzlich den gleichen medizinischen Anwendungen ermöglichen.

Gemäß vorliegender Erfindung bedeutet die Bezeichnung "Hybridisierung" übliche Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise Bedingungen mit einer Salzkonzentration von  $6 \times \text{SSC}$  bei 62 bis 66°C, gefolgt von einem einstündigen Waschen mit  $0,6 \times \text{SSC}$ , 0,1% SDS bei 62 bis 66°C.

Bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind DNA-Sequenzen, wie oben definiert, die aus Wirbeltieren, vorzugsweise Säugern, wie etwa Schweinen, Kühen und Nagern, wie etwa Ratten oder Mäusen, und insbesondere von Primaten, wie etwa Menschen, erhältlich sind bzw. entsprechenden Sequenzen nachgebildet sind.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die in SEQ ID NO. 1 gezeigte und als MP-121 bezeichnete Sequenz. Die Transkripte von MP-121 wurden aus Leber-Gewebe erhalten und codieren für ein Protein, das eine beträchtliche Aminosäurehomologie zum reifen Teil der Inhibin/Aktivin-artigen Proteine zeigt (siehe Fig. 1). Die Proteinsequenzen von humanem  $\alpha$ -Inhibin, Inhibin  $\beta$ A und Inhibin  $\beta$ B sind bei Mason et al. (Biochem. Biophys. Res. Comm. 135, 957—964 (1986)) beschrieben. Einige typische Sequenzhomologien, die für bekannte Inhibin-Sequenzen spezifisch sind, wurden auch im Propeptidteil von MP-121 gefunden, während andere Teile des Propeptids von MP-121 erhebliche Unterschiede zu Inhibin-Propeptiden zeigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie eines erfindungsgemäßen DNA-Moleküls enthält. In einem derartigen Vektor ist die erfindungsgemäße DNA-Sequenz vorzugsweise operativ mit einer Expressionskontrollsequenz verknüpft. Solche Vektoren eignen sich zur Herstellung von TGF- $\beta$ -artigen Proteinen in stabil- oder transient-transformierten Zellen. Verschiedene Tier-, Pflanzen-, Pilz- und Bakteriensysteme können zur Transformation und die anschließende Kultivierung verwendet werden. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Vektoren für die Replikation in der Wirtszelle notwendige Sequenzen und sind autonom replizierbar. Weiterhin ist die Verwendung von Vektoren bevorzugt,

die selektierbare Markergene enthalten, wodurch die Transformation einer Wirtszelle nachweisbar ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit einer erfindungsgemäßen DNA oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist. Beispiele von geeigneten Wirtszellen umfassen verschiedene eukaryontische und prokaryontische Zellen wie, etwa E.coli, Insektenzellen, Pflanzenzellen, Säugerzellen und Pilze, wie etwa Hefe.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein der TGF- $\beta$ -Familie, das von einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 codiert wird. Vorzugsweise weist das erfindungsgemäße Protein die in SEQ ID NO. 2 gezeigte Aminosäuresequenz oder gegebenenfalls funktionelle Anteile davon (wie oben definiert) auf und zeigt biologische Eigenschaften, wie etwa Gewebe-induktive Fähigkeiten, die möglicherweise für eine therapeutische Anwendung relevant sind. Die oben genannten Merkmale des Proteins können abhängig von der Bildung von Homodimeren oder Heterodimeren mit anderen Proteinen mit Cystine Knot Motif und insbesondere TGF- $\beta$ -Proteinen variieren. Solche Strukturen können sich ebenfalls für klinische Anwendungen geeignet erweisen und bilden daher ebenfalls einen Gegenstand der vorliegenden Anmeldung. Bevorzugte Heterodimere schließen Heterodimere aus einem Monomer des erfindungsgemäßen Proteins und Monomeren der  $\alpha$ -,  $\beta$ A- oder  $\beta$ B-Inhibin-Ketten ein. Die sich aus der Heterodimerbildung ergebenden Eigenschaften können mehr in Richtung der Eigenschaften von Aktivin bzw. Inhibinen verschoben sein. Wenn z. B. ein Heterodimer mit Inhibin u-Proteinen bzw. mit anderen Inhibin  $\beta$ -Proteinen gebildet wird, wird davon ausgegangen, daß das MP121/Inhibin ( $\alpha$ -Kette)-bzw. MP121/Aktivin ( $\beta$ A oder  $\beta$ B-Kette)-Heterodimer die Herstellung von Follikel-stimulierendem Hormon (FSH) inhibieren bzw. aktivieren könnte. MP121/Aktivin Heterodimere könnten auch z. B. Einfluß auf die Mesoderm-Entwicklung nehmen. Es kann weiterhin erwartet werden, daß heterodimere Formen mit einem Mitglied der BMP-Gruppe der TGF- $\beta$ -Proteine dazu führen, daß BMP-ähnliche Aktivitäten verstärkt werden, wie z. B. die Fähigkeit, die Knochenbildung, Knorpelbildung oder Bildung von Bindegewebe zu induzieren bzw. zu fördern.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind daher heterodimere Proteine eines erfindungsgemäßen Proteins der TGF- $\beta$ -Familie, das von einer DNA-Sequenz nach Anspruch 1 codiert wird, mit einem Monomer eines Proteins mit Cystine Knot Motif, bevorzugt eines anderen Mitglieds der TGF- $\beta$ -Familie. Ähnliche heterodimere Proteine sind in der WO 93/09229, EP 0 626 451 A2 und J. Biol. Chem. 265 (1990), 13198—13205 beschrieben.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind chimäre Proteine, die funktionelle Derivate bzw. Anteile des Proteins gemäß SEQ ID NO. 2, insbesondere funktionelle Anteile des reifen Proteins aufweisen und darüber hinaus Anteile eines anderen Proteins. Das andere Protein kann hierbei wiederum ein Protein mit Cystine Knot Motif sein, das vorzugsweise auch zur TGF- $\beta$ -Familie gehört, wie z. B. insbesondere MP52 (PCT/EP94/02630). Es können jedoch auch Anteile eines komplett anderen Proteins vorhanden sein, z. B. Rezeptor-bindende Domänen von Proteinen, welche dem ursprünglichen MP121-Protein eine andere Spezifität verleihen.

Die biologischen Eigenschaften der erfindungsgemäßen Proteine, vorzugsweise MP-121, können z. B. in Assays gemäß Wrana et al. (Cell 71, 1003—1014 (1992)), Ling et al. (Proc. Natl. Acad. of Science, 82, 7217—7221 (1985)), Takuwa et al. (Am. J. Physiol., 257, E797-E803 (1989)), Fann und Patterson (Proc. Natl. Acad. of Science, 91, 43—47 (1994)), Broxmeyer et al. (Proc. Natl. Acad. of Science, 85, 9052-9056 (1988)), Green et al. (Cell, 71, 731—739 (1992)) oder Partridge et al. (Endocrinology, 108, 213—219 (1981)) bestimmt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Proteins der TGF- $\beta$ -Familie, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man eine mit einer erfindungsgemäßen DNA oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformierte Wirtszelle kultiviert und das TGF- $\beta$ -Protein aus der Zelle oder/und aus dem Kulturüberstand gewinnt. Ein solches Verfahren umfaßt die Kultivierung der transformierten Wirtszelle in einem geeigneten Kulturmedium und die Reinigung des erzeugten TGF- $\beta$ -artigen Proteins. Auf diese Weise ermöglicht das Verfahren die Herstellung einer ausreichenden Menge des gewünschten Proteins zum Einsatz bei der medizinischen Behandlung oder in Anwendungen unter Verwendung von Zellkulturtechniken, bei denen Wachstumsfaktoren benötigt werden. Die Wirtszelle kann ein Bakterium, wie etwa Bacillus oder E.coli, ein Pilz, wie etwa Hefe, eine Pflanzenzelle, wie etwa Tabak, Kartoffel oder Arabidopsis oder eine tierische Zelle, insbesondere eine Wirbeltierzelllinie, wie etwa Mo-, Cos- oder CHO-Zelllinien oder eine Insektenzelllinie sein. Bei der Herstellung in Bakterien kann es vorkommen, daß das erfindungsgemäße Protein in Form von Einschußkörpern (inclusion bodies) produziert wird. Diese inclusion bodies werden dann nach an sich bekannten Methoden renaturiert und das Protein dann in einer aktiven Form erhalten (siehe z. B. Jaenicke, R. u. Rudolph, R., Protein Structure, ed. Creighton, T.E., IRL Press, Chapter 9). Zur Herstellung von heterodimeren Proteinen mit anderen Mitgliedern der TGF- $\beta$ -Familie werden beide Proteinmonomere entweder in derselben Zelle oder getrennt exprimiert, wobei auch eine gemeinsame Renaturierung bei anfallenden Formen von inclusion bodies geeignet erscheint. Bei Coexpression in derselben Zelle sind insbesondere auch virale Systeme, wie z. B. das Baculoviren-System oder das Vaccina Virus System geeignet.

Die Herstellung von heterodimeren Proteinen ist prinzipiell dem Fachmann bekannt und z. B. in der WO 93/09229 und der EP 0 626 451 A2 beschrieben.

Die Herstellung von chimären Proteinen mit anderen Proteinanteilen erfordert eine entsprechende Veränderung auf DNA-Ebene, die dem Fachmann geläufig ist und durch ihn durchgeführt werden kann (EMBO J. 10 (1991), 2105—2110; Cell 69 (1992), 329—341; J. Neurosci. 39 (1994), 195—210).

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen, die eine pharmazeutisch wirksame Menge eines erfindungsgemäßen TGF- $\beta$ -artigen Proteins als Wirkstoff enthalten. Gegebenenfalls umfaßt eine solche Zusammensetzung einen pharmazeutischen akzeptablen Träger-, Hilfs-, Verdünnungs- oder Füllstoff. Eine solche pharmazeutische Zusammensetzung kann bei der Wundheilung und Gewebewiederherstellung alleine oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen, z. B. anderen Proteinen der TGF- $\beta$ -Familie oder Wachstumsfaktoren, wie etwa EGF (epidermal growth factor) oder PDGF (platelet derived growth factor) verwendet werden. Ferner kann eine solche pharmazeutische Zusam-

mensetzung bei der Krankheitsprävention verwendet werden.

Weitere Gegenstände sind pharmazeutische Zusammensetzungen, die erfindungsgemäße heterodimere Proteine oder/und chimäre Proteine enthalten.

Bevorzugt wird die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung eingesetzt zur Behandlung und Prävention von Knochen-, Knorpel-, Bindegewebs-, Haut-, Schleimhaut-, Endothel-, Epithelial-, Neuronal-, Hirn-, Renal- oder Zahnschädigungen, zur Anwendung bei Zahnimplantaten, zur Anwendung in Wundheilungs- oder Gewebewiederherstellungsprozessen, als Morphogen zum Einsatz zur Induktion von Lebergewebewachstum, Induktion der Proliferation von Vorläuferzellen oder Knochenmarkszellen, zur Beibehaltung eines Differenzierungszustandes und zur Behandlung von Fertilitätsstörungen oder zur Empfängnisverhütung.

Eine andere mögliche klinische Anwendung des erfindungsgemäßen TGF- $\beta$ -artigen Proteins ist die Verwendung als Suppressor der Immunreaktion zur Vermeidung der Abstoßung von Organtransplantaten oder ein Einsatz im Zusammenhang mit der Angiogenese. Ferner kann das erfindungsgemäße Protein zur Fertilitätssteigerung oder Empfängnisverhütung eingesetzt werden. Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann auch prophylaktisch oder in der kosmetischen Chirurgie verwendet werden. Weiterhin ist die Anwendung der Zusammensetzung nicht auf Menschen beschränkt, sondern kann auch Tiere, insbesondere Haus- und Nutztiere umfassen.

Im übrigen kann bei heterodimeren Proteinen und chimären Proteinen die Einsatzmöglichkeit und Spezifität auch durch den Anteil des anderen Proteins bzw. anderen Monomers wie gewünscht variiert werden.

Generell können mit den erfindungsgemäßen Proteinen Krankheiten behandelt werden, die mit der Expression von MP121 zusammenhängen, einerseits durch die Erhöhung der Menge bzw. der Aktivität an vorhandenem MP121, auf der anderen Seite auch durch Unterdrückung der MP121-Aktivität. So ist ein weiterer Gegenstand der Erfindung die Herstellung von Antisense-Nukleinsäuren und Ribozymen, die die Translation von MP121 hemmen. Diese Hemmung kann entweder durch Maskieren der mRNA mit einer Antisense-Nukleinsäure erfolgen oder durch Spaltung mit einem Ribozym.

Die Herstellung von Antisense-Nukleinsäuren ist bekannt (Weintraub, H.M., Scientific American 262: 40 (1990)). Die Antisense-Nukleinsäuren hybridisieren mit der entsprechenden mRNA und bilden ein doppelsträngiges Molekül, welches dann nicht mehr translatiert werden kann. Die Verwendung von Antisense-Nukleinsäuren ist z. B. aus Marcus-Sekura, C.J., Anal. Biochem. 172 (1988), S. 289—295 bekannt.

Ribozyme sind RNA-Moleküle, die die Fähigkeit besitzen, spezifisch andere einzelsträngige RNA-Moleküle ähnlich wie DNA-Restriktionsendonukleasen zu spalten. Die Herstellung von Ribozymen ist in Cech, J. Amer. Med. Assn. 260 (1988), S. 3030 beschrieben.

Erfindungsgemäß ist es hierbei auch möglich, geeignete Vektoren mit der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz in vitro oder in vivo in Patientenzellen zu transfizieren oder die Vektoren in vitro in Zellen zu transfizieren und diese dann einem Patienten zu implantieren. Ebenso können MP121-Antisense-Polynukleotide in Zellen eingebracht werden, die eine ungewünschte Expression von MP121 zeigen.

Eine Unterdrückung der MP121-Aktivität kann auch erfolgen durch Bindung von Molekülen, die im Gegensatz zu MP121 keine Signalweiterleitung auslösen, an die MP121-Rezeptoren.

Es sind daher im Rahmen der Erfindung auch die Rezeptoren für MP121 an Zellen von Interesse. Zum Auffinden von Rezeptoren können zunächst verschiedene Zelllinien auf ihr Bindungsverhalten von radioaktiv markiertem MP121 ( $^{125}\text{J}$ -MP121) mit anschließendem cross-linking getestet werden. Von Zellen, die MP121 binden, kann nachfolgend eine cDNA-Bibliothek in einem Expressionsvektor (erhältlich bei InVitrogen) angelegt werden. Zellen, die mit Rezeptor-cDNA transfiziert wurden, können dann über die Bindung von radioaktiv markiertem MP121 selektiert werden. Dies sind dem Fachmann bekannte Methoden, wie sie z. B. für die Isolierung von Activin- (Mathews, L.S. & Vale, W.W., Cell 65 (1991), 973—982) und TGF- $\beta$ -Rezeptoren Typ II (Lin, H. Y. et al., Cell 68 (1992), 775—785) verwendet wurden. Es ist in Analogie zu den bekannten Activin-Rezeptoren zu vermuten, daß es sich bei dem MP121-Rezeptor ebenfalls um einen in diese Familie gehörenden Rezeptorkomplex handelt, so daß zum Auffinden von Teilen des heteromeren Komplexes weitere dem Fachmann bekannte Methoden, wie z. B. PCR mit degenerierten Oligonukleotiden, verwendet werden können. Diese Methode ist z. B. auch bei den Activin- und TGF- $\beta$ -Rezeptoren Typ I angewendet worden (Tsuchida et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 11242—11246; Attisano et al., Cell 75 (1993), 671—680; Franzen et al., Cell 75 (1993), 681—692).

Schließlich ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Antikörper, der spezifisch an die erfindungsgemäßen Proteine binden kann, oder ein derartiges Antikörperfragment (z. B. Fab oder Fab'). Verfahren zur Herstellung eines solchen spezifischen Antikörpers oder Antikörperfragments gehören zum allgemeinen Fachwissen des Durchschnittsfachmanns. Vorzugsweise ist ein solcher Antikörper ein monoklonaler Antikörper. Solche Antikörper oder Antikörperfragmente könnten sich auch für diagnostische Methoden eignen.

Weiterhin soll die Erfindung durch die folgenden Beispiele veranschaulicht werden.

#### Beispiel 1

##### Isolierung von MP-121

1.1 Gesamt RNA wurde aus menschlichem Lebergewebe (40jähriger Mann) nach der Methode von Chirgwin et al. (Biochemistry, 18, 5294—5299 (1979)) isoliert. Poly (A+) -RNA wurde aus der Gesamt-RNA durch Oligo (dT) -Chromatographie gemäß den Vorschriften des Herstellers (Stratagene Poly (A) Quick-Säulen) abgetrennt.

1.2 Für die reverse Transkriptionsreaktion wurden 1 bis 2,5  $\mu\text{g}$  Poly (A+) -RNA für 5 Minuten auf 65°C erhitzt und schnell auf Eis abgekühlt. Das Reaktionsgemisch enthielt 27 U RNA-Guard (Pharmacia), 2,5  $\mu\text{g}$

Oligo (dT)<sub>12-18</sub> (Pharmacia), 5 × Puffer (250 mmol/l Tris/HCl pH 8,5, 50 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/l DTT, 5 mmol/l von jedem dNTP, 600 mmol/l KCl) und 20 U AMV reverse Transcriptase (Boehringer Mannheim) pro µg Poly (A +)-RNA. Das Reaktionsgemisch (25 µl) wurde 2 Stunden lang bei 42°C inkubiert. Der cDNA Pool wurde bei -20°C aufbewahrt.

1.3 Die in Fig. 2 gezeigten Deoxynukleotidprimer OD und OID wurden auf einem automatischen DNA-Synthesizer (Biosearch) hergestellt. Die Reinigung erfolgte durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese und Isolierung der Hauptbande aus dem Gel durch Isotachophorese. Die Oligonukleotide wurden durch Vergleich der Nukleinsäuresequenzen von bekannten Mitgliedern der TGF-β-Familie und Auswahl von Regionen mit hoher Konservierung entworfen. Ein Vergleich dieser Region ist in Fig. 2 gezeigt. Zur Erleichterung der Klonierung enthielten beide Oligonukleotide Eco RI-Schnittstellen und OD enthielt zusätzlich eine Nco I-Restriktionsschnittstelle an seinem 5'-Terminus.

1.4 Bei der PCR-Reaktion wurde 20 ng Poly (A +)-RNA entsprechende cDNA (siehe 1.2) als Ausgangsmaterial verwendet. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 50 µl durchgeführt und enthielt 1 × PCR-Puffer (16,6 mmol/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 mmol/l Tris/HCl pH 8,8, 2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 6,7 µmol/l EDTA, 10 mol/l β-Mercaptoethanol, 170 µg/ml Rinderserumalbumin (Gibco), 200 µmol/l von jedem dNTP (Pharmacia), 30 pmol von jedem Oligonukleotid (OD und OID) und 1,5 U Taq-Polymerase (Ampli-Taq, Perkin Elmer Cetus). Das Reaktionsgemisch wurde mit Paraffin überschichtet und es wurden 40 PCR-Zyklen durchgeführt. Die Produkte der PCR-Reaktion wurden durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und durch Ethanolpräzipitation konzentriert.

1.5 Die Hälfte der PCR-Reaktionsprodukte wurde mit den Restriktionsenzymen SphI (Pharmacia) und AlwNI (Biolabs) entsprechend den Vorschriften des Herstellers gespalten. Die zweite Hälfte wurde in einer Serie von Reaktionen mit Ava I (BRL), AlwNI (Biolabs) und Tfi I (Biolabs) geschnitten. Die Restriktionen wurden in 100 µl mit 8 U Enzym über 2 bis 12 Stunden bei 37°C durchgeführt (außer bei Tfi I bei 65°C).

1.6 Die Produkte der Restriktionsspaltung wurden durch Agarosegelelektrophorese fraktioniert. Nach Anfärbung mit Ethidiumbromid wurden nicht gespaltene Amplifikationsprodukte aus dem Gel herausgeschnitten und durch Phenolextraktion isoliert. Die erhaltene DNA wurde anschließend zweimal durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt.

1.7 Nach Ethanolpräzipitation wurde ein Viertel oder ein Fünftel der isolierten DNA reamplifiziert, wobei die gleichen Bedingungen wie für die primäre Amplifikation verwendet wurden, außer daß die Anzahl der Zyklen auf 13 verringert wurde. Die Reamplifikationsprodukte wurden gereinigt, mit den gleichen Enzymen wie oben geschnitten und die ungeschnittenen Produkte wurden, wie oben für die Amplifizierungsprodukte erläutert, aus Agarosegelen isoliert. Der Reamplifizierungsschritt wurde wiederholt.

1.8 Nach der letzten Isolierung aus dem Gel wurden die Amplifikationsprodukte durch 4 U Eco RI (Pharmacia) unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen gespalten. Ein Viertel des Restriktionsgemisches wurde in den mit Eco RI gespaltenen Vektor pBluescript SK+ (Stratagene) ligiert. Nach Ligation wurden 24 Klone jeder Enzymkombination durch Sequenzieren weiteranalysiert. Der Ansatz, der mit AlwNI und SphI geschnitten wurde, enthielt keine neuen Sequenzen, nur BMP6 und Inhibin βA Sequenzen. 19 identische neue Sequenzen, MP-121 genannt, wurden in den mit Ava I, AlwNI und Tfi I geschnittenen Ansätzen gefunden. Diese Plasmide wurden pSK-MP121 (OD/OID) genannt. Eine Sequenz unterschied sich von dieser hauptsächlich gefundenen Sequenz an zwei Nukleotiden. Die Ligation und Transformation in E.coli wurde wie in Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual (1989) beschrieben durchgeführt.

Der Klon wurde zum 3'-Ende der cDNA nach der ausführlich von Frohmann (veröffentlicht von Perkin-Elmer Corp., Amplifications, 5, 11 - 15 (1990)) beschriebenen Methode vervollständigt.

Dieselbe Leber-mRNA, welche zur Isolation des ersten MP-121 Fragmentes benutzt wurde, wurde, wie oben beschrieben, revers transkribiert unter Verwendung von Oligo dT (16mer) verbunden mit dem Adapterprimer (AGAATTCGCATGCCATGGTCGACGAAGC -T<sub>16</sub>). Die Amplifikation wurde mit dem Adapterprimer (AGAATTCGCATGCCATGGTCGACG) und einem internen Primer (GGCTACGCCATGAACCTCTGCA-TA), nach der MP-121 Sequenz hergestellt, durchgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden mit einem weiteren internen Primer (ACATAGCAGGCATGCCTGGTATTG), hergestellt nach der MP-121 Sequenz, und dem Adapterprimer reamplifiziert. Die Reamplifikationsprodukte wurden nach Restriktion mit SphI in den ebenso geschnittenen Vektor pT7/T3 U19 (Pharmacia) kloniert und sequenziert. Die Klone wurden durch ihre Sequenzüberlappung mit dem bereits bekannten Teil der MP121-Sequenz charakterisiert. Ein Klon, genannt p121Lt 3' MP13, wurde benutzt, um ein Nco I (stumpf gemacht mit T4 Polymerase)/SphI Fragment zu isolieren. Dieses Fragment wurde in einen der oben erwähnten pSK-MP121 (OD/OID) Vektoren kloniert, dessen OD-Primer Sequenz zum T7 Primer der pSK Multiple Cloning Site orientiert war. Dazu wurde der Vektor mit SphI und SmaI restringiert. Das Konstrukt wurde pMP121DFus6 genannt. Es beinhaltet die MP-121 Sequenz von Position 922 bis 1360 wie in SEQ ID NO.1 gezeigt.

1.9 Ein Dde I Fragment von pMP-121DFus6, welches von Position 931 bis 1304 in SEQ ID NO. 1 reicht, wurde zum Screenen einer humanen Leber cDNA Library (Clontech, # HL3006b, bot 36223) verwendet, wie es ausführlich bei Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, veröffentlicht von Greene Publishing Associates und Wiley-Interscience (1989)) beschrieben ist. Aus 8,1 × 10<sup>5</sup> Phagen wurden 24 Mischplaques gepickt und vereinzelt. Daraus wurden 10 Klone, die mit PCR unter Verwendung der Primer LO2 (ACATAGCAGGCATGCCTGGTATTG) und LO11 (CTGCAGCTGTGTTGGCCTTGAGA) aus dem Dde I Fragment, ein positives Signal ergaben, ausgewählt und vereinzelt. Die cDNA wurde über eine EcoRI-Restriktion aus den Phagen isoliert und in den ebenfalls mit EcoRI gespaltenen pBluescript



## SK-Vektor kloniert.

Eine Sequenzierung eines der resultierenden Plasmide, SK121L9.1, zeigte, daß das Startcodon an Position 128 von SEQ ID NO. 1 beginnt, da drei Stopp-Codons in-frame vor diesem Startcodon an Position 62, 77 und 92 liegen. Der Start des reifen MP121 liegt bei Position 836 von SEQ ID NO. 1, legt man die Sequenzanalogie zu anderen TGF- $\beta$  Proteinen zu Grunde, was der Aminosäure 237 in SEQ NO. 2 entspricht. Das Stoppcodon beginnt an Position 1184 der SEQ ID NO. 1.

Das Plasmid SK121L9.1 wurde unter der Hinterlegungsnummer 9177 bei der DSM am 26.4.94 hinterlegt.

## Beispiel 2

## Expression von MP121

Die Expression von MP121 ist sowohl in eukaryontischen als auch in prokaryontischen Systemen möglich.

Für die Expression in Prokaryonten wurde nur der reife Anteil von MP121 verwendet. Nach Aufreinigung kann das in E.coli als Monomer exprimierte reife MP121 Protein dann zu einem Dimer zurückgefallen werden. Um die Aufreinigung des MP121 zu vereinfachen, können an den N-Terminus des reifen Proteins zusätzlich 6 Histidine gehängt werden, die durch Bindung an Nickelchelate-Säulen die Aufreinigung des Proteins erleichtern.

Beispielhaft wurde der reife Anteil von MP121 (Aminosäure 237 bis 352 in SEQ ID NO. 2) mit 13 zusätzlichen Aminosäuren einschließlich 6 Histidinen am N-Terminus (MHHHHHHKLEFAM) in dem prokaryontischen Vektor pBP4 exprimiert. Dieser Vektor ist ein pBR322 Derivat mit Tetracyclinresistenz der zusätzlich den T7 Promoter aus dem pBluescript II SK Plasmid (Stratagene) enthält. Weiterhin enthält der Vektor nach dem T7-Promoter eine ribosomale Bindestelle und ein Startcodon gefolgt von 6 Codons für Histidin. Hinter mehreren singulären Restriktionsschnittstellen wie Eco RI, Xho I, Sma I und Apa I für die Insertion von Inserts sowie Stopcodons in allen drei Leserahmen folgt ein Terminator (T $\phi$ ). Zum Erhalt der cDNA für den reifen Anteil von MP121 wurde eine PCR mit den beiden Oligonukleotiden GAATTCGCCATGGGCATCGACTGCCAAG-GAGG und CCGCTCGAGAAGCTTCAACTGCACCCACAGGC auf dem Plasmid SK121L9.1 (DSM Hinterlegungsnummer: 9177) durchgeführt. Beide Oligonukleotide enthalten an den Enden hinzugefügte Restriktionsschnittstellen (Eco RI und Nco I bzw. Xho I und Hind III).

Das resultierende 377 bp Fragment wurde stumpfendig in den mit Eco RV restringierten Vektor pBluescript II SK (Stratagene) zwischenkloniert. Ein Klon mit der Orientierung des 5', Endes von MP121 zum T7-Promoter wurde mit Eco RI restringiert und das resultierende Insert (0.38 kb) in den ebenfalls mit Eco RI restringierten pBP4 Vektor kloniert. Die richtige Orientierung des Inserts beim resultierenden Plasmid pBP4MP121His wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung festgestellt. Das Plasmid pBP4MP121His wurde am 30.1.1995 bei der DSM (Hinterlegungsnummer: 9704) hinterlegt.

Die Expression von MP121 Protein kann durch gleichzeitige Bereitstellung von T7-RNA Polymerase erfolgen. Die T7-RNA Polymerase kann über verschiedene Methoden bereitgestellt werden, wie z. B. ein zweites Plasmid mit einem Gen für T7 RNA Polymerase oder durch Infektion mit Phagen, die für die T7 RNA Polymerase codieren oder aber durch spezielle Bakterienstämme, die das Gen für T7 RNA Polymerase integriert haben. Unter Verwendung des Bakterienstammes BL21(DE3)pLysS (Novagen, #69451-1) und Induktion der T7 RNA Polymerase-Expression nach Herstellerangaben mit IPTG, wird das reife MP121 Protein mit His-Tag (MP121His) in Einschlusskörpern gebildet. Das Protein zeigt in SDS-Polyacrylamid-Gelen (15%) ein apparentes Molekulargewicht von knapp 16 kD (theoretisches Molekulargewicht: 14.2 kD) wie es repräsentativ im Western-blot der Fig. 3 gezeigt ist. Die mit pBP4 transformierten Bakterien als Kontrollen zeigen jeweils keine Anfärbung spezifischer Banden. Aufgrund des His-Tag kann dieses Protein über Nickelchelatebildende Säulen wie z. B. beschrieben in Hochuli et al. (BIO/Technology Vol. 6, 1321–1325 (1988)) gereinigt werden.

Eine zusätzliche Reinigung ist möglich über eine Reversed Phase HPLC. Es wurde einer Reversed Phase Säule (Nucleosil 300-7C4 von Macherey-Nagel, Art. 715023) mit einer Flußrate von 2 ml/min und einem Acetonitrilgradienten in 0.1% TFA von 0 bis 90% in 100 min verwendet. Unter diesen Bedingungen eluiert MP121His ab ca. 40% Acetonitril.

Der Nachweis, daß es sich um MP121 Protein handelt, wurde jeweils über Western blot Analyse mit MP121 spezifischen Antikörpern geführt. Polyklonale Antikörper gegen MP121 wurden sowohl in Hühnern als auch in Kaninchen erzeugt. Zum Erhalt des Antigens für die Immunisierung wurde ein Teil des reifen Anteils von MP121 (Aminosäure 260 bis 352 in SEQ ID NO. 2) mit den ersten 98 Aminosäuren der Polymerase des MS2-Bakteriophagen fusioniert und in E.coli exprimiert. Nach Isolation der Einschlusskörper wurde das Fusionsprotein (MS2-MP121) auf Polyacrylamid-Gelen separiert und nach Kupferfärbung durch Elektroelution (Tessmer, U. & Dernick, R., IBL (1990) 8–13) für die Immunisierung isoliert. Mit Antikörpern sowohl aus Hühnern als auch aus Kaninchen ist es möglich, spezifisch Expression von MP121 nachzuweisen. Für den schematisierten Western blot in Fig. 3 wurden Hühner-Antikörper verwendet, die über PEG-Präzipitation (Thalley B. S. u. Carroll, S.B., BIO/Technology Vol. 8, 934–938 (1990)) und über Membrangebundenes Antigen (Fusionsprotein (MS2-MP121)) (18.17 in Sambrook et al. Molecular Cloning, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) weitergehend aufgereinigt waren. Als zweiter Antikörper wurde Anti-Chicken IgG mit gekoppelter alkalischer Phosphatase (Sigma A9171) eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit dem Tropix Western-Light Protein Detection Kit (Serva #WL10RC) nach Herstellerangaben.

Um biologisch aktives Material zu erhalten, kann das in E.coli exprimierte und aufgereinigte monomere MP121 zu einem dimeren MP121 zurückgefallen werden. Dies kann nach Methoden wie z. B. beschrieben von Jaenicke, R. & Rudolph, R. (Protein structure, ed. Creighton, T.E., IRL Press, Chapter 9) erfolgen.

Für die Expression in eukaryontischen Zellen wurde das Vaccinia Viren Expressionssystem verwendet, wie es

ausführlich und für den Fachmann nacharbeitbar in den Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, Wiley & Sons), im folgenden abgekürzt mit CP, unter Chapter 16 Unit 16.15–16.18 beschrieben ist. Das System beruht darauf, daß Fremd-DNA unter Verwendung bestimmter Vektoren durch homologe Rekombination in das Vaccinia Virus Genoms integriert werden kann. Zu diesem Zweck enthält der verwendete Vektor das TK (Thymidinkinase) Gen aus dem Vaccinia Genom. Um eine Selektion auf rekombinante Viren zu ermöglichen, enthält der Vektor weiterhin das E.coli Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase Gen (gpt) (Falkner, F.G. & Moss, B., J. of Virol. 62 (1988), 1849–1854). In diesen Vektor wurde die cDNA mit dem gesamten codierenden Bereich für MP121 kloniert.

Um die 5' und 3' nicht translatierten Bereiche aus dem ursprünglichen Plasmid SK121L9.1 (DSM, Hinterlegungsnummer: 9177) zu verkürzen und an den Enden singuläre Restriktionsschnittstellen einzufügen, waren PCR Reaktionen und Zwischenklonierungen notwendig. Alle PCR Reaktionen wurden mit dem Plasmid SK121L9.1 (DSM Hinterlegungsnummer: 9177) durchgeführt. Zur Verkürzung des 5' nicht translatierten Endes wurde der Primer CCCGGATCCGCTAGCACCATGACCTCCTCATTGCTTCTG mit einer eingefügten Bam HI und NheI Restriktionsschnittstelle in einer PCR mit einem internen Primer (CCCTGTTGTCCTCTA-GAAGTG) benutzt. Das gewonnene Fragment wurde in Bluescript SK (Stratagene) zwischenkloniert, sequenziert und auf Übereinstimmung mit der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Sequenz überprüft. Für ein verkürztes 3' nicht translatiertes Ende wurde das Sph I/Eco RI Fragment (0.22 kb) aus dem Plasmid pBP4MP121His verwendet.

Die beiden End-Fragmente von MP121 wurden über interne Restriktionsschnitte (Xba I und Sph I) mit der fehlenden mittleren DNA Sequenz aus dem Plasmid SK121L9.1 (DSM Hinterlegungsnummer: 9177) nach Standardmethoden (Sambrook et al. Molecular Cloning, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989) verbunden. Die so erhaltene verkürzte cDNA mit dem vollständigen Leserahmen für MP121 (Nukleotid 128 bis Nukleotid 1184 in SEQ ID No. 1) konnte über Ausnutzung der Restriktionsschnitte Bam HI und Eco RI in den ebenso geschnittenen Vektor pBPI kloniert werden. Das resultierende Plasmid pBPIMP121 wurde am 12.1.95 bei der DSM (Hinterlegungsnummer: 9665) hinterlegt.

Das Plasmid pBPIMP121 wurde für die Herstellung von rekombinanten Vaccinia Viren eingesetzt. Dazu wurden zu 80% konfluente 143B Zellen (HuTk-, ATCC CRL 8303) in 35 mm Kulturschalen mit Vaccinia Wildtyp Virus in 1 ml PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln infiziert (1 Virus auf 10 Zellen). Nach Absaugen des Überstandes und Zugabe von 2 ml Kulturmedium (MEM, Gibco BRL #041-01095 mit 1:500 verdünntem Penicillin und Streptomycin Gibco BRL #043-05140) wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde anschließend entfernt und die Transformation dieser Zellen mit 100 ng pBPIMP121, 2 µg Träger DNA (Kalbsthymus, Ultraschall behandelt, Boehringer Mannheim #104175) und 10 µl Lipofektin (Gibco BRD #18292-011) in 1 ml MEM für ca. 15 h bei 37°C erreicht. Nach Zugabe von 1 ml MEM mit 20% FCS (Sigma #F-7524) wurde für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert und die lysierten Zellen anschließend eingefroren.

Die gpt Selektion auf die Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase und Isolation und Amplifizierung einzelner rekombinanter Viren erfolgte im wesentlichen wie in Unit 16.17 der CP beschrieben, mit dem Unterschied, daß RK13 Zellen (ATCC CCL 37) verwendet wurden.

Die Integration der MP121 cDNA in das Virus Genom wurde durch Dot blot Analyse (CP Unit 16.18) bestätigt. Ein rekombinantes Virus aus der Transfektion mit pBPIMP121 sowie der Wildtyp Virus wurden für Expressionsanalysen in den Zelllinien 143B (HuTk-, ATCC CRA 8303, human) und NIH-3T3 (DSM ACC 59, swiss mouse embryo) eingesetzt. Die Zellen wurden nach den Angaben der Hersteller kultiviert. Die konfluenten Zellen wurden mit der dreifachen Anzahl an Viren für 30 Minuten bei 37°C infiziert und anschließend das entsprechende Kulturmedium mit 10% FCS und Penicillin/Streptomycin (1 : 500, Gibco BRD #043-05140) zugefügt. Nach 6 Stunden bei 37°C wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit z. B. HBSS (Gibco BRD #14180-046) gewaschen und Produktionsmedium (MEM für HuTk- bzw. DMEM mit 4,5 g/l Glucose und NEAA (Gibco BRL #11140-035) für NIH-3T3 jeweils versetzt mit Aprotinin (Fluka #10820, 50 U/ml) und Penicillin/Streptomycin) ohne FCS zugesetzt. Nach 20 bis 22 Stunden Produktion wurde der Zellüberstand gesammelt. Die Analyse der Expression erfolgte durch Western blots nach Standardmethoden (CP Unit 10.8). Dafür wurden die Proteine aus 1 bis 3 ml Zellkulturüberstand durch Zugabe des äquivalenten Volumens an Aceton und Inkubation von mindestens einer Stunde auf Eis präzipitiert und abzentrifugiert. Nach Resuspension des Pellets in Auftragspuffer (7 M Harnstoff, 1% SDS, 7 mM Natriumdihydrogenphosphat, 0,01% Bromphenolblau und gegebenenfalls 1% β-Mercaptoethanol) erfolgte die Auftrennung in 15%igen Polyacrylamidgelen. Als Markerproteine wurde ein vorgefärbter Protein-Molekulargewicht standard (Gibco BRL #6041-020) eingesetzt. Der Transfer auf PVDF Membran (Immobilon #IPVH00010) und das Abblocken der Membran erfolgten nach Standardmethoden.

Eine repräsentative schematisierte Zeichnung der Western blot Ergebnisse in Fig. 3 zeigt, daß bei den rekombinanten Viren MP121 spezifische Banden auftreten. Die Expression von MP121 in NIH-3T3 Zellen führt zu einem sekretierten Protein mit einem im Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen erscheinenden Molekulargewicht von ungefähr 18 kDa (erwartetes theoretisches Molekulargewicht: 25 kDa). Unter reduzierenden Bedingungen läuft das Protein bei ungefähr 15 kDa im Gel (erwartetes theoretisches Molekulargewicht: 12,5 kDa). Diese Ergebnisse zeigen, daß MP121 wie zu erwarten als dimeres reifes Protein exprimiert wird. Das relativ wenig verlangsamte Laufverhalten des dimeren MP121 Proteins gegenüber dem monomeren MP121 Protein ist wahrscheinlich mit einer globulären Struktur zu begründen. Die Prozessierung des Vorläuferproteins zum reifen Protein konnte auch in HuTK-Zellen gezeigt werden. Bei mit Wildtyp Viren (ohne integrierte Fremd-DNA) infizierten Zellen (HuTK- oder NIH-3T3) traten keine Banden im Western blot auf.

Das Vaccinia Expressionssystem eignet sich bei Kotransfektion mit rekombinanten Vaccinia Viren, die für unterschiedliche Mitglieder der TGF-β-Familie codieren, insbesondere auch für die Bildung von Heterodimer n.



Über Affinitätssäulen mit spezifischen Antikörpern gegen die einzelnen TGF- $\beta$ -Familienmitglieder ist es dann möglich, Heterodimere von Homodimeren zu trennen. Insbesondere von Interesse sind dabei die  $\alpha$ - sowie die  $\beta$ A- und  $\beta$ B-Ketten der Inhibine.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## DE 195 11 243 A1

SEQ ID NO.1

	10	20	30	40	50	
5	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
	CAAGGAGCCA	TGCCAGCTGG	ACACACACTT	CTTTAAGGGC	GTCTGGCAGC	50
	CAGGACAGAG	TTCAGCCAC	AGCTGTTCAG	ACCCACAGCC	CTCAGTCTGT	100
	ATTGCTCAAG	AAGGGCCTTC	CCAGCAATG	ACCTCTCAT	TGCTTCTGGC	150
10	CTTTCTCTCT	CTGGCTCCAA	CCACAGTGGC	CACTCCAGCA	GCTGGGGTTC	200
	AGTGTCCAGC	ATGTGGGGGG	CCACCTTTGG	AACGTGACAG	CCAGGGGAG	250
	CTGCTTCTTG	ATCTGGCCAA	GAGAAGCATC	TTCGACAAGC	TGCACCTCAC	300
	CCAGCGCCCA	ACACTGAACC	GGCTGTGTTC	CAGAGCTGCT	TTCAGGACTG	350
15	CACGTGAGCA	CCCTCCAGGG	GTCCACAGG	GGGCATTTCT	ACAGGACAAC	400
	AGGCAACAGG	AATGTGAAT	CATCAGCTTT	GCTCAGCAG	GCTCTCCAC	450
	CATCAACCAG	ACTGTCTTG	ATTTTCACTT	CTCTCTCAT	AGAACTGCTG	500
20	GTGACAGGCA	GGTCCAGCAG	GCCAGTCTCA	TGTTCTTTGT	GCAGTCCCT	550
	TCCAATACCA	CTTGGACCTT	GAAAGTGACA	GTCTTTGTTC	TGGGTCCACA	600
	TAATACCAAC	CTCACCTTGG	CTACTCAGTA	CTGTCTGGAG	GTCGATGCCA	650
	GTGGCTGGCA	TCAACTCCCC	CTAGGGCCTG	AAGCTCAAGC	TGCTTGACGC	700
25	CAGGGGCACC	TGACCCCTGA	GCTGGTACTT	GAGGOCAGG	TAGCCACAG	750
	CTCAGTCATC	CTGGGTGGAG	CTGCCCATTAG	GCTTTTGTG	GCAGCCGGG	800
	TGACAGTTGG	GGGCAACAC	CAGATTCAAC	GACGAGCAT	CGACTGCCAA	850
30	GGAGGGTCCA	GGATGTGCTG	TGCACAACAG	TTTTTTGTGG	ACTTCCGTCA	900
	GATTGGCTGG	CACCACTGCA	TCATCCAGCC	TGAGGGCTAC	GCCATCAACT	950
	TCGTGATAGG	GCAGTGCCCA	CTACACATAG	CAGGCATGCC	TGGTATGTCT	1000
	GCTCTCTTTC	ACACTGCAGT	GCTCAATCTT	CTCAAGGCCA	ACACAGCTGC	1050
35	AGGCACCACT	GGAGGGGGCT	CATCTGTGT	ACCCACGGCC	CGGGGCCCC	1100
	TGTCTCTGCT	CTATTATGAC	AGGCACAGCA	ACATTGTCAA	CATCTCATA	1150
	CCTGACATGG	TAGTAGAGGC	CTGTGGGTGC	AGTTAGTCTA	TGTGTGGTAT	1200
	GGGCAGCCCA	AGGTTGCATG	GCAAAACAAG	CCCTACACA	AGTGCATTC	1250
40	CTTGACAGCA	GGCAATGACC	TCATTCTCTG	TCCAGAAATG	GCCTCCCTC	1300
	TTCTCTAGCA	TCTTATGCAA	ATTACCCAC	CTTTGACTTG	AACAATCCTT	1350
	CATCTAAAGC	AAGTCACGT	GCCATCTTCC	TGACCACTAC	CTCTTTCTCT	1400
45	AGGGCATAGT	CCATCCCGCT	AGTCCATCCC	GCTAGCCCA	CTCCAGGCAC	1450
	TCAGACCCAT	CTCCAACCAT	CAGCAATGCC	ATCTGGTTCC	CAGGCAAGA	1500
	CACCTTACG	TCACCTTTAA	TAGACCCCAT	AACCCACTAT	GCTTCTCTGT	1550
	CCTTTCTACT	CAATGGTCCC	CACTCCAAGA	TGAGTTGACA	CAACCCCTTC	1600
50	CCCCAATTTT	TGTGCATCTC	CACAGAGGCC	CTTCTTTGCA	TTACCAAAG	1650
	TTTACATCAC	TGCTGCCCAA	AATAGAGGCT	TACCTACCCC	CTCTTTTCTT	1700
	GTGAGCCCTT	GTCCTTCTTA	GTGTCTCAGG	TGAATCTATA	AAGCTCTCTT	1750
	TGCATACCTT	CATCCATTTT	TTGTCTCTCT	CCTGCTTTCT	CTATGCCCTT	1800
55	AAGGGGTGAC	TTGCCCTGAG	TCTATCACCT	CAGCTCCCTT	GCTCTCTGGC	1850
	TTCTCTCTCA	GGTCAGGSCA	TTTCTTATCC	CTGTCTCTCT	TCTGTCTAGG	1900
	TGTCATGGTT	CTGTGTAAT	GTGGCTATTC	TGTGTCTCT	CATTAATCTG	1950
	CTACCCCTTT	CCATGGCCCC	AGCTCTGGCT	ACATCTCTCT	TTTTTTTTTT	2000
60	TTTTTTTTTT	TGAAAAGTAA	AAAATTCCTT	AAATTTTTAT	TCTGTGTAAC	2050
	ACTACCAACA	TTTACAGGGC	AATATACTTG	ATGTAATCAA	AACAATAACA	2100
	AAAAGACAAA	GCTACAACAG	ATAAAACACC	TCAGCAATGT	ACATCTAATT	2150
65	CACACTACAT	TGCATTATTC	AATAGCTGCA	CTTTTGTCAA	ACTGTGGCTA	2200
	TGACAGTCTT	GACCAAGAG	GCTTCTCTGT	TTAGCTGCA	GTAATTTTTC	2250
	TGACTATGCA	TCATCGTTCC	TT			2272

10	20	30	40	50		
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890		5
MISSLLLAFL	LIAPTTVATP	RAGGQCPACG	GPTILELESQR	ELILLAKRS	50	
ILDKLHLTOR	PTLNRPVSRA	ALRIALQHLH	GVEQCALLEE	NREQECETIS	100	
FAETGLSTIN	QIRLDFHFSS	DRIDAGDREVQ	QASIMFFVQL	PSNTTWILKV	150	
RVLVLGPHNT	NLTILATQYLL	EVDASGWHQL	PLGPEAQAAC	SQGHILTELV	200	10
LEGVAQSSV	ILGGAHRPF	VAARVRVGCK	HQIHRRGIDC	QGGSRMCCRQ	250	
EEFVDFREIG	WHDWLIQPEG	YAMNFCIGQC	PLHIDCMFET	AASFHTAVLN	300	
LLKANTAAGT	TGGGSCCVPT	ARRELSILYY	DRDSNIVKTD	IPDMVVEACG	350	
CS					352	15

## Patentansprüche

1. DNA-Molekül, das für ein Protein der TGF- $\beta$ -Familie codiert und
  - a) den für das reife Protein codierenden Anteil und gegebenenfalls weitere funktionelle Anteile der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz,
  - b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz,
  - c) eine einem allelischen Derivat einer der Sequenzen aus (a) und (b) entsprechende Nukleotidsequenz, oder
  - d) eine mit einer der Sequenzen aus (a), (b) oder (c) hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt unter der Voraussetzung, daß ein DNA-Molekül gemäß (d) zumindest den für ein reifes Protein der TGF- $\beta$ -Familie codierenden Anteil vollständig enthält.
2. DNA-Molekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es neben einem der Anteile (a) bis (d) von Anspruch 1 eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die für zumindest einen Teil eines anderen Proteins codiert und so angeordnet ist, daß sich nach Expression ein Fusionsprotein ergibt.
3. Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eine Kopie eines DNA-Moleküls nach Anspruch 1 oder 2 enthält.
4. Wirtszelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einer DNA nach Anspruch 1 oder 2 oder einem Vektor nach Anspruch 3 transformiert ist.
5. Wirtszelle nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Bakterium, ein Pilz, eine pflanzliche oder eine tierische Zelle ist.
6. Protein der TGF- $\beta$ -Familie, das von einer DNA Sequenz nach Anspruch 1 oder 2 codiert wird.
7. Protein nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es die in SEQ ID NO. 2 gezeigte Aminosäuresequenz oder gegebenenfalls funktionelle Anteile davon aufweist.
8. Chimäres Protein, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Protein gemäß Anspruch 6 oder 7 und zumindest einen Teil eines anderen Proteins enthält.
9. Heterodimeres Protein, dadurch gekennzeichnet, daß es aus einem Monomer eines Proteins gemäß Anspruch 6, 7 oder 8 und einem Monomer eines anderen Proteins aus der Superfamilie mit "Cystine Knot Motif" besteht.
10. Verfahren zur Herstellung eines Proteins gemäß einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Wirtszelle nach Anspruch 4 oder 5 kultiviert und das Protein aus der Zelle oder/und dem Kulturüberstand gewinnt.
11. Verfahren zur Herstellung eines heterodimeren Proteins gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Coexpression beider Monomere in einer Wirtszelle durchführt.
12. Verfahren zur Herstellung eines heterodimeren Proteins gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man eine gemeinsame Renaturierung von Einschlußkörpern beider Monomere bewirkt.
13. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens ein Protein nach einem der Ansprüche 6 bis 9 als Wirkstoff gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger-, Hilfs-, Verdünnungs- oder Füllstoffen enthält.
14. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 13 zur Behandlung oder Prävention von Knochen-, Knorpel-, Bindegewebs-, Haut-, Schleimhaut-, Endothel-, Epithelial-, Neuronal-, Hirn-, Renal- oder Zahnschädigungen, zur Anwendung bei Zahnimplantaten, zur Anwendung in Wundheilungs- oder Gewebewiederherstellungsprozessen, als Morphogen zum Einsatz zur Induktion von Lebergewebewachstum, Induktion der Proliferation von Vorläuferzellen oder Knochenmarkszellen, zur Beibehaltung eines Differenzierungszustandes und zur Behandlung von Fertilitätsstörungen oder zur Empfängnisverhütung.
15. Anti-sense RNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie komplementär zu einem Teil eines DNA-Moleküls gemäß Anspruch 1 ist.
16. Ribozym, dadurch gekennzeichnet, daß es ein RNA-Molekül, das man nach Transkription eines DNA-Moleküls nach Anspruch 1 erhält, spezifisch spaltet.
17. Verwendung einer Antisense-RNA gemäß Anspruch 15 oder eines Ribozyms gemäß Anspruch 16 zur

Blockierung der Expression eines Proteins gemäß einem der Ansprüche 6 und 7.

18. Verwendung einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder 2 oder eines Vektors gemäß Anspruch 3 zur in vitro oder in vivo Transfektion von Patientenzellen.

19. Antikörper oder Antikörperfragmente, dadurch gekennzeichnet, daß sie an ein Protein nach einem der Ansprüche 6 bis 9 binden.

20. Rezeptor, dadurch gekennzeichnet, daß ein Protein gemäß einem der Ansprüche 6 und 7 spezifisch an ihn bindet.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Fig. 1

	10	20	30	40
MP121	CCRQEFFVDF	REIGWHDWII	QPEGYAMNFC	IGQCPLHIAG
INHIB $\beta$ A	CCKKQFFVSF	KDIGWNDWII	APSGYHANYC	EGECPSHIAG
INHIB $\beta$ B	CCRQQFFIDF	RLIGWNDWII	APTGYGYNYC	EGSCPAYLAG
INHIB $\alpha$	CHRVALNISF	QELGWERWIV	YPPSFIFHYC	HGGCGLHIP-
	* + + + + + + + *	+ + + * * + * * +	* + + + *	* * + + + + + +
	50	60	70	80
MP121	MPGIAASFHT	AVLNLLKANT	AAGTTGGGSC	C--VPTARRP
INHIB $\beta$ A	TSGSSLSFHS	TVINHYRMRG	HSPFANLKSC	C--VPTKLRP
INHIB $\beta$ B	VPGSASSFHT	AVVNQYRMRG	LNP-GTVNSC	C--IPTKLST
INHIB $\alpha$	---PNLSLPV	PGAPPTPAQP	YSLLPGAQPC	CAALPGTMRP
	+ + + * + + +	+ + + +	+ + *	* + * + + +
	90	100	110	
MP121	LSLLYYDRDS	NIVKTD-IPD	MVVEACGCS	
INHIB $\beta$ A	MSMLYYDDGQ	NIKKD-IQN	MIVEECGCS	
INHIB $\beta$ B	MSMLYFDEY	NIVKRD-VPN	MIVEECGCA	
INHIB $\alpha$	LHVRTTSDGG	YSFKYETVPN	LLTQHCACI	
	+ + + + +	+ + * + + +	+ + + * + *	



Fig. 2a

EcoRI NcoI

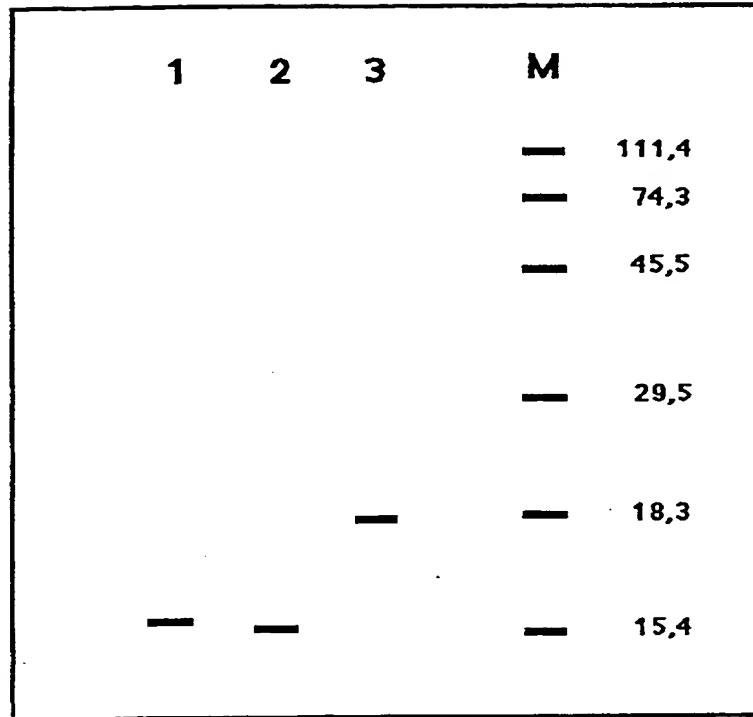
OD	ATGAATTC	CATGGACCTGGGCTGGMAKGAMTGGAT
BMP 2		ACGTGGGGTGGGAATGACTGGAT
BMP 3		ATATTGGCTGGAGTGAATGGAT
BMP 4		ATGTGGGCTGGAAATGACTGGAT
BMP 7		ACCTGGGCTGGCAGGACTGGAT
TGF- $\beta$ 1		AGGACCTCGGCTGGAAAGTGGAT
TGF- $\beta$ 2		GGGATCTAGGGTGGAAATGGAT
TGF- $\beta$ 3		AGGATCTGGGCTGGAAAGTGGGT
INHIBIN $\alpha$		AGCTGGGCTGGGAACGGTGGAT
INHIBIN $\beta_A$		ACATCGGCTGGAAATGACTGGAT
INHIBIN $\beta_B$		TCATCGGCTGGAAACGACTGGAT

Fig. 2b

EcoRI

OID	ATGAATTC	GAGCTGCGTSGGSRACACAGCA
BMP 2		GAGTTCTGTGGGACACACAGCA
BMP 3		CATCTTTTCTGGTACACACAGCA
BMP 4		CAGTTCAGTGGGCACACAACA
BMP 7		GAGCTGCGTGGGCGCACACAGCA
TGF- $\beta$ 1		CAGCGCCTGCGGCACGCAGCA
TGF- $\beta$ 2		TAAATCTTGGGACACGCAGCA
TGF- $\beta$ 3		CAGGTCCCTGGGGCACGCAGCA
INHIBIN $\alpha$		CCCTGGGAGAGCAGCACACAGCA
INHIBIN $\beta_A$		CAGCTTGGTGGGCACACAGCA
INHIBIN $\beta_B$		CAGCTTGGTGGGAATGCAGCA

Fig. 3



Figur 3: Schematisierter Western blot mit Hühner Antikörpern gegen MP121

- 1: E.coli Zellen transformiert mit pBP4MP121His unter reduzierenden Bedingungen (1%  $\beta$ -Mercaptoethanol)
- 2: Zellkulturüberstand von NIH-3T3 Zellen nach Infektion mit rekombinanten Viren (mit insertierter MP121 cDNA) unter reduzierenden Bedingungen (1%  $\beta$ -Mercaptoethanol)
- 3: Zellkulturüberstand von NIH-3T3 Zellen nach Infektion mit rekombinanten Viren (mit insertierter MP121 cDNA) unter nicht reduzierenden Bedingungen
- M: vorgefärbter Protein-Molekulargewichtsmarker mit den angegebenen apparenten Molekulargewichten (Gibco BRL #26041-020)